动 物 学 研 究 2004, Apr. 25 (2): 127~131 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

基于线粒体细胞色素 *b* 基因序列探讨红喉姬鹟两亚种的分类地位

李 伟，张雁云*
（北京师范大学 生命科学学院，生物多样性与生态工程教育部重点实验室，北京 100875）

摘要：以线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因的全序列作为遗传标记，探讨红喉姬鹟普通亚种（*Ficedula parva albicilla*）和指名亚种（*F. p. parva*）的分类地位。应用 Kimura 2-parameter 法计算出红喉姬鹟普通亚种个体间的遗传距离为 0.1%~0.2%，而与指名亚种之间的遗传距离为 6.4%，两亚种之间的遗传距离远远大于种间的遗传距离。结合形态学的特征我们认为：红喉姬鹟指名亚种和普通亚种应为两个独立种，分别为红喉姬鹟（*F. albicilla*）和红胸姬鹟（*F. parva*），两者的分化时间为 3.15~3.25 百万年。

关键词：红喉姬鹟；亚种；分类；细胞色素 *b* 基因
中图分类号：Q959.739；Q951.3　**文献标识码**：A　**文章编号**：0254-5853(2004)02-0127-05

Subspecific Taxonomy of *Ficedula parva* Based on Sequences of Mitochondrial Cytochrome *b* Gene

LI Wei, ZHANG Yan-yun
(*Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Engineering, Beijing Normal University, Beijing* 100875, *China*)

Abstract: It was disputed that *Ficedula parva parva* and *F. p. albicilla* were two species or two subspecies. Complete sequences of mitochondrial cytochrome *b* gene were used as a genetic marker to study the taxonomic status of them. The genetic distance between *F. p. albicilla* and *F. p. parva* was 6.3% based on the Kimura's two Parameter's method, which was far more than the genetic distance between other species of *Ficedula*. The results suggest that *F. p. albicilla* and *F. p. parva* should be two species, their names are *F. albicilla* and *F. parva* separately, and the divergence time between *F. p. albicilla* and *F. p. parva* is 3.15 to 3.25 My.

Key words: *Ficedula prava*; Subspecies; Taxonomy; Cytochrome *b* gene

红喉姬鹟（*Ficedula parva*）属于雀形目（Passeriformes）鹟科（Muscicapidae）姬鹟属（*Ficedula*）（Cheng，2000）。红喉姬鹟以前被分为 3 个亚种（Dementive & Gladkov，1954；Vaureie，1959），后来鉴于分布在克什米尔地区的亚种在羽色和翅式上与其他两亚种不同，而将其单列为一独立种——印巴姬鹟（*F. subrubra*）。目前一般认为红喉姬鹟仅有 2 个亚种的分化，即普通亚种（*F. p. albicilla*）和指名亚种（*F. p. parva*）（Walters，1980；Howard & Moore，1991；Ali & Ripley，1995）。其中指名亚种分布于欧洲中部、东部和喜马拉雅山西部，越冬于印度北部；普通亚种分布在中国、朝鲜、蒙古、俄罗斯远东、勘察加半岛和西伯利亚，往西到乌拉尔山南部，越冬在印度、缅甸、中南半岛和马来西亚等地区（Clements，2000）。有学者认为这两个亚种在形态和鸣声上具有明显的差异，应将它们提升为两个独立种（Svensson，1992），但该观点未能得到广泛支持（Ali & Ripley，1995；Clements，2000）。

随着分子生物学技术的迅速发展，分子进化已

收稿日期：2003-11-03；接受日期：2004-02-03
基金项目：国家自然科学基金资助项目（30170115）
*通讯作者，电话：010-62205399，E-mail：zhangyy@bnu.edu.cn，北京师范大学生命科学学院，100875

成为近年来进化生物学研究中的一个重要方面。由于鸟类的形态进化（或表型进化）比较清晰，成为分子进化研究的焦点（Zhang & Shi，1991；Chen et al，2002）。有关鸟类分类及进化的许多有价值的结果是从形态结构、生理特征及化石资料中得到的，由于客观条件的限制和分类学家对动物性状的看法不一致，许多分类问题长期得不到根本解决（Zhang，1994；Chen et al，2002），分子生物学手段的应用可为解决这些问题提供一些重要的佐证（Kong et al，2000）。

DNA具有易于获取和富含大量进化信息等优点，已被广泛地应用在生物进化的研究中（Zhang，1996）。在研究种内和种间进化关系方面，快速进化的线粒体DNA是一种有效的分子标记。线粒体DNA虽然含有许多功能基因，基因组长度及组织结构十分保守，但是一级结构的变化却十分活跃，进化速率比典型的单拷贝核DNA序列要快5~10倍（Brown，1983），其中细胞色素 *b*（cytochrome *b*，Cyt *b*）基因是在鸟类分子系统学中最常用的分子遗传标记（Mindell，1997）。已有的研究结果显示，Cyt *b* 基因的种间分歧度为1%~10%，这一分歧度既能区别物种，又可忽略多重替换（Moritz et al，1987）。本文旨在通过Cyt *b* 基因序列的测定和分析，探讨红喉姬鹟两个亚种的分类地位。

1 材料和方法

1.1 材料来源

红喉姬鹟于2002年采自北京，共5个个体，其中4个个体的样本为肝脏，1个为羽毛，-20℃冷冻保存。

1.2 总DNA的提取

肝脏经蛋白酶K消化，酚-氯仿抽提后，由乙醇沉淀得到总DNA（参照Sambrook et al，1999）。总DNA用30 μL TE（10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA；pH 8.0）50℃水浴溶解10 min，取少量DNA溶液经琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭（EB）染色后，在紫外灯下观察提取结果，并利用紫外分光光度计（DU-640，Beckman，German）定量后稀释，-20℃储存备用。

用无菌水清洗羽毛根部表面的杂物，然后用灭菌的剪刀从羽根尖端起剪取约2 mm的羽轴，剪碎。加入400 μL提取液（参照Taberlet & Bouvet，1991），55℃水浴消化过夜。酚:氯仿:异戊醇（体积比为25:24:1）抽提2次；加入冰冷无水乙醇-20℃沉淀2 h，再用70%乙醇洗涤2遍。总DNA用20 μL TE（10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA；pH 8.0）50℃水浴溶解10 min。

1.3 细胞色素 *b* 基因的扩增及序列测定

进行PCR反应以及测序用的引物为H16067（5′-AGCCTTCAATCTTTGGCTTACA AG-3′）、L14731（5′-AATTGCATCCCACTTAATCGA-3′）（Saetre et al，2001）和作者实验室设计的测序引物L15180（5′-CCTACATATCGGACGAGG-3′）。PCR反应体系内含10×buffer 2.5 μL（Takara）、dNTP混和液2 μL（浓度分别为2.5 mmol/L，Takara）、两条引物各1 μL（浓度均为10 μmol/L）、Taq DNA聚合酶1 U（Takara）及50 ng总DNA，用去离子水补充至25 μL。PCR在PTC-200（MJ Research）上进行，共运行35个循环，条件为：94℃变性30 s，58℃退火25 s，72℃延伸50 s。第一次循环前94℃预变性8 min，最后一次循环后于72℃延伸6 min。

PCR产物经W5212柱离心式胶回收试剂盒（华舜）纯化后作为测序反应的模板。测序仪器为ABI 310，所用试剂盒（Kit）为：ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequecing Ready Reaction Kit（ABI，USA）。测序反应体系内含模板40 ng（PCR产物）、BigDye Mix 2 μL、引物1 μL（浓度为3.2 μmol/L），用灭菌的 ddH_2O 补足10 μL。然后根据Kit推荐的反应条件进行sequence PCR。测序反应产物经纯化（参照ABI，USA），用ABI 310全自动测序仪进行正反链双向测序。DNA序列通过ABI 310测序收集软件（2.0）和分析软件（3.4.1）确定。

1.4 数据分析

DNA序列片段经SeqEdit软件（ABI，USA）拼接，并反向重复测序进行校正后，得到完整的Cyt *b* 基因序列。用DNAstar进行同源序列比对，用Mega2（Kumar et al，2001）进行核酸序列组成、密码子不同位点的变异、转换与颠换数目的统计，利用Mega2中的Kimura 2-parameter法进行遗传距离计算。结合GenBank中已经发表的埃特勒斯姬鹟（*F. speculigera*）（AJ299688）、半领姬鹟（*F. semitorquata*）（AJ299687，AJ299686）、白领姬鹟（*F. albicollis*）（AJ299685）、斑姬鹟（*F. hypoleuca*）（AJ299683，AJ299684）等姬鹟属鸟类线粒体Cyt *b* 序列，以及Saetre et al（2001）采自捷克的红喉姬鹟指名亚种

(*F. p. parva*)样品的同源序列(AJ299689)，利用 Mega2(Kumar et al, 2001)中的邻接法(Neighbour-joining)构建 NJ 树，利用最大简约法(Maximum parsimony)构建 MP 树。在重建系统进化树时，用斑鹟(*Muscicapa striata*)(AJ299690)和拉美孤鸫(*Myadestes ralloides*)(AF295087)作为外群，同时应用自举检验(Bootstrap test)估计系统树中节点的置信度，共 1 000 次循环。

2 结　果

2.1 Cyt *b* 功能基因的鉴定

将 DNA 序列翻译成蛋白质序列，在蛋白质序列上找到一些 Cyt *b* 的保守成分，如结合亚铁血红素的组氨酸等，证明所得到的 Cyt *b* 基因序列是来自于线粒体 DNA，而不是核假基因。

2.2 两亚种 Cyt *b* 基因序列的组成和差异

实验获得红喉姬鹟普通亚种 *albicilla* Cyt *b* 基因的长度为 1 143 bp，5 个个体呈现 4 种不同的单倍型（GenBank 登录号：AY536744，AY536745，AY536746，AY536747）。红喉姬鹟指名亚种 *parva* 的同源序列来自 GenBank（AJ299689）。红喉姬鹟 Cyt *b* 基因序列都起始于 ATG 密码子，终止于 TAA 密码子，1 143 个碱基可编码 380 个氨基酸，两亚种 5 条同源序列共有 70 个位点出现差异（图 1），Cyt *b* 基因密码子不同位点的碱基组成情况见表 1。两亚种间的遗传距离和碱基的转换、颠换见表 2。

2.3 系统进化树

MP 树（图 2）和 NJ 树的拓扑结构几乎完全一样。从 MP 树可见，姬鹟属鸟类分成 2 组：红喉姬鹟普通亚种的 4 个单倍型聚在一块，然后再与红喉姬鹟的指名亚种聚在一起，形成第一组；其他 4 种姬鹟属鸟类聚在一块，构成第二组。

3 讨　论

红喉姬鹟指名亚种和普通亚种在形态上存在着明显的差异，前者的雄鸟喉部及上胸部呈桔红色，后者仅喉部呈桔红色，而上胸部为灰色横斑，且两亚种在鸣声上有巨大的差异，所以有的学者建议将其分为 2 个种（Svensson，1992），但没有引起广泛的认同。我们在分子水平上也发现 2 亚种间存在非常大的差异。

在鸟类中，种与种之间的 Cyt *b* 遗传距离一般应在1.0%以上，而亚种间的差异则小于1.0%（Krajewski & Fetzner, 1994; Xiangyu et al, 2000）。

```
                                                                              111
                          11111 1111112222 2222333344 4444455555 5666667777 7778888888 9999999000
                     3346701122 3444580125 6789566824 5667801467 8024690223 4460113469 4578899224
                     1320251779 9147961922 4927406794 1257346057 8145665292 1754031311 2103469011
F. p. albicilla(1)   CACCAAGCGC ACTCTGCTAC TCCCAATTAT TCGAACTCAG CCCTCGTCAG CCATATTCTT TCATTTAGAC
F. p. albicilla(2)   .......... .......... .......... .......... .........A .......... ..........
F. p. albicilla(3)   .......... .......... .......... .......... .........A .......... ..........
F. p. albicilla(4)   .......... .......... .......... .......... .........A ....T..... ..........
F. p. albicilla(5)   ......A... .......... .......... .......... .........A .......... ..........
F. p. parva          TGTTGGATAT GTCTCATCTT CTTTCGCCGC CTAGGACTGA TTTCTAATGT TTGC.CCTCA CTGCCCGAGA
```

图 1　红喉姬鹟普通亚种（*F. p. albicilla*）和指名亚种（*F. p. parva*）细胞色素 *b* 基因序列的差异

Fig. 1　Nucleotide variances of sequences in mitochondrial cyt *b* gene from *F. p. albicilla* and *F. p. parva*

表 1　红喉姬鹟两亚种细胞色素 *b* 基因密码子不同位点的碱基组成平均值 (%)

Table 1　Base composition for cyt *b* sequences of two subspecies of *F. parva* in different positions of the genetic codon

	全序列 Total sequences	第一位点 1st position	第二位点 2nd position	第三位点 3rd position
T	23.7	20.3	40.4	10.5
A	27.9	24.1	20.7	38.9
C	34.8	30.9	26.2	47.3
G	13.6	24.8	12.6	3.4

表 2 红喉姬鹟两亚种的遗传距离（右上角）和转换/颠换（左下角）

Table 2 Genetic distance (above the diagonal) and substitutions (ts/tv, below the diagonal) between two subspecies of *F. parva*

	1	2	3	4	5
1 *F. p. albicilla* 1		0.001	0.002	0.002	0.064
2 *F. p. albicilla* 2	1/0		0.001	0.001	0.064
3 *F. p. albicilla* 3	1/1	0/1		0.002	0.065
4 *F. p. albicilla* 4	2/0	1/0	1/1		0.063
5 *F. p. parva*	62/7	62/7	62/8	61/7	

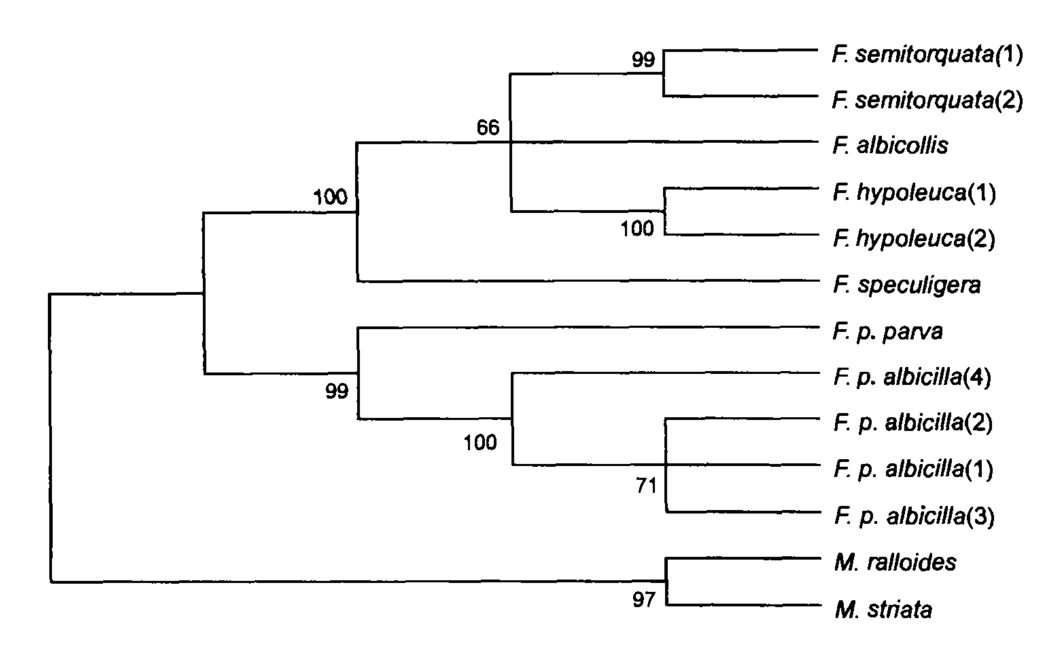


图 2 利用 MP 法构建的姬鹟属细胞色素 *b* 基因序列的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree using maximum parsimony method inferred from mitochondrial cyt *b* gene sequences of *Ficedula*

在红喉姬鹟普通亚种的 5 个个体中，有 4 个单倍型，个体间的遗传距离为 0.1% ~ 0.2%，而与指名亚种之间的遗传距离达到了 6.3% ~ 6.5%。利用 Kimura 2-parameter 计算出埃特勒斯姬鹟、半领姬鹟、白领姬鹟、斑姬鹟等姬鹟属鸟类之间的遗传距离为 2.8% ~ 3.4%。我们的研究结果显示红喉姬鹟 2 亚种之间的平均遗传距离（6.4%）已大大超过了姬鹟属其他鸟类种间的遗传距离，已经达到种的分歧水平，应视为 2 个独立的种：红喉姬鹟（*Ficedula albicilla*）和红胸姬鹟（*Ficedula parva*）。按鸟类线粒体 Cyt *b* 的进化速率为每百万年变化 2% 的模型计算（Shields & Wilson, 1987），红喉姬鹟和红胸姬鹟的分歧年代距今为 3.15 ~ 3.25 百万年。

在根据 Cyt *b* 基因序列构建的 MP 树（图 2）和 NJ 树中，我们还可看出姬鹟属鸟类的 6 个种已形成了 2 个单系群：红喉姬鹟和红胸姬鹟形成了一个单系群，埃特勒斯姬鹟、半领姬鹟、白领姬鹟、斑姬鹟等 4 种鸟类形成了另外一个单系群。在前一个单系群里，红喉姬鹟和红胸姬鹟分化的 BP 支持率很高，为 99%；在后一个单系群中，埃特勒斯姬鹟首先分化出来，BP 支持率为 100%，而另 3 个种分化的顺序不详。

参考文献：

Ali S, Ripley SD. 1995. A Pictorial Guide to the Birds of the Indian Subcontinent (2nd ed) [M]. London: Oxford Univ. Press. 149.

Brown WM. 1983. Evolution of Animal Mitochondrial DNA [M]. Sunderland, Mass: Sinauer Associates. 62 - 88.

Chen XF, Li S, Wang L, Yuan XD, Tang MQ, Li QW. 2002. A review on mitochondrial DNA of avian [J]. *Hereditas* (Beijing), **24** (3): 371-375. [陈晓芳, 李　爽, 王　黎, 袁晓东, 汤敏谦, 李庆伟. 2002. 鸟类线粒体 DNA 研究概述, 遗传. **24** (3): 371-375.]

Cheng TH. 2000. A Complete Checklist of Species and Subspecies of the Chinese Birds [M]. Beijing: Science Press. 150. [郑作新. 2000. 中国鸟类种和亚种分类名录大全. 北京: 科学出版社. 150.]

Clements JF. 2000. A Checklist of Birds of the World [M]. Sussex: Pica Press. 460.

Dementive GP, Gladkov NA. 1968. Birds of the Soviet Union (Vol.4) [M]. Translated by Birron A, Cole ZS. Jerusalem: Israel Program for Scientific Translation. 121-127.

Howard R, Moore A. 1991. A Complete Check-list of the Birds of the World (2nd ed.) [M]. London: Academic Press. 384.

Kong QP, Luo J, Huang SY, Xiangyu JG, Zhang YP. 2000. Mitochondrial cytochrome *b* gene sequences and classification of three species of genus *Mystacoleucus* [J]. *Hereditas* (Beijing), **22** (6): 379-384. [孔庆鹏, 罗　静, 黄顺友, 向余劲攻, 张亚平. 2000. 从线粒体细胞色素 *b* 探讨长臂鲃属三个种分类与进化的关系. 遗传, **22** (6): 379-384.]

Krajewski C, Fetzner JJW. 1994. Phylogeny of cranes (Gruiformes: Gruidae) based on cytochrome *b* DNA sequences [J]. *The Auk*, **111** (2): 351-365.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. Mega2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software [CP]. Bioinformatics.

Mindell DP. 1997. Avian Molecular Evolution and Systematics [M]. San Diego, California: Academic Press. 84-86.

Moritz C, Dowling TE, Brown WM. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics [J]. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **18**: 269-292.

Saetre GP, Borge T, Lindell J, Moum T, Primmer CR, Sheldon BC, Haavie J, Johnsen A, Ellegren H. 2001. Speciation, introgressive hybridization and nonlinear rate of molecular evolution in flycatchers [J]. *Mol. Ecol.*, **10** (3): 737-749.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1999. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.) [M]. Translated by Jin DY, Li MF et al. Beijing: Science Press. 463-469. [萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 1999. 分子克隆实验指南 (第二版). 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社. 463-469.]

Shields GE, Wilson AC. 1987. Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese [J]. *Mol. Evol.*, **24**: 212-217.

Svensson L. 1992. Identification Guide to European Passerines (4th ed.) [M]. Stockholm: Vierde Uitgebreide en Herziene Editie. 223.

Taberlet P, Bouvet J. 1991. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies [J]. *The Auk*, **108**: 959-960.

Vaureie C. 1959. The Birds of the Palearctic Fauna (Passeriformes) [M]. London: H F & G Wither by Limited. 316-325.

Walters M. 1980. The Complete Birds of the World [M]. Newton Abbot: David & Charles. 237.

Xiangyu JG, Yang L, Zhang YP. 2000. Sequence divergence between *Chrysolophus amherstiae* and *Chrysolophus pictus* [J]. *Hereditas* (Beijing), **22** (4): 225-228. [向余劲攻, 杨　岚, 张亚平. 2000. 白腹锦鸡和红腹锦鸡的遗传分化. 遗传, **22** (4): 225-228.]

Zhang YP. 1994. Some issues in molecular systematics [J]. *Zool. Res.*, **15** (1): 1-10. [张英培. 1994. 分子分类的若干问题. 动物学研究, **15** (1): 1-10.]

Zhang YP. 1996. From DNA sequences to species tree [J]. *Zool. Res.*, **17** (3): 247-252. [张亚平. 1996. 从 DNA 序列到物种树. 动物学研究, **17** (3): 247-252.]

Zhang YP, Shi LM. 1991. Polymorphism in the mtDNA of three species of Pheasants [J]. *Zool. Res.*, **12** (4): 387-392. [张亚平, 施立明. 1991. 两种锦鸡和环颈雉 mtDNA 的比较研究. 动物学研究, **12** (4): 387-392.]